

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ КАРДИОМИОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ КАРДИОМИОПАТИИ

Куприянова А.Г., Белецкая Л.В., Зайденев В.А., Салтгареев Р.Ш., Гольц А.М., Захаревич В.М., Готье С.В.

ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова»
Минздравсоцразвития России, г. Москва

При оценке состояния структурных белков кардиомиоцитов у больных различными формами кардиомиопатии (49 образцов миокарда) выявлены изменения, характерные для дилатационной кардиомиопатии, а также общие нарушения молекулярной структуры, развивающиеся вне зависимости от этиологии заболевания.

Ключевые слова: структурные белки кардиомиоцитов, дилатационная кардиомиопатия, ишемическая кардиомиопатия.

EVALUATION OF THE MACROMOLECULAR STRUCTURE OF CARDIAC MYOCYTES IN PATIENTS WITH VARIOUS FORMS OF CARDIOMYOPATHY

Kupriyanova A.G., Beletskaya L.V., Zaidenov V.A., Saitgareev R.Sh., Golts A.M., Zakharevich V.M., Gautier S.V.

Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

Assessing the condition of the structural proteins of cardiomyocytes in patients with various forms of cardiomyopathy (49 samples) revealed changes characteristic for dilated cardiomyopathy, as well as common disorders of the molecular structure, developing, regardless of the etiology of the disease.

Key words: structural proteins of cardiomyocytes, dilated cardiomyopathy, ischemic cardiomyopathy.

Термином «кардиомиопатия» обозначают гетерогенную группу заболеваний миокарда, неуклонно прогрессирующих и приводящих к тяжелым формам хронической сердечной недостаточности. В частности, пятилетняя выживаемость пациентов после постановки диагноза дилатационная кардиомиопатия составляет 50% [19]. Наиболее эффективным, а иногда и единственным способом лечения больных при этом является трансплантация сердца. С развитием медицинской генетики в последние годы произошел значительный прорыв в понимании природы данной патологии, в частности была предложена новая классификация кардиомиопатий [25]. Успехи фармакотерапии обусловили некото-

рую тенденцию к увеличению продолжительности жизни больных, однако проблема ранней диагностики, выбора тактики лечения и возможного прогнозирования течения заболевания остается актуальной. Это особенно важно при воспалительной (постмиокардитической) форме кардиомиопатии, интерес к которой в последние годы резко возрос [3, 32].

Состояние молекулярной структуры кардиомиоцитов у больных тяжелыми хроническими заболеваниями сердца привлекает внимание исследователей и кардиологов в аспекте понимания процессов, приводящих к дисфункции органа [1, 2, 6, 15, 23, 27]. Кардиомиоцит является сложноорга-

Статья поступила в редакцию 13.04.12 г.

Контакты: Куприянова Анна Геннадьевна, к. м. н., зав лабораторией иммуногистохимии.

Тел. 8 916 353 76 06, e-mail: annak2003@bk.ru

низированной клеткой, в структуру которой входит целый ряд белков, выполняющих значительное количество функций: осуществление передачи сигнала и участие в процессе сокращения и расслабления, удержание ее формы, взаимодействие с внеклеточным матриксом и внутриклеточными органеллами, а также соединение друг с другом соседних клеток. В здоровом сердце сочетание структурных белков оптимально. При ряде форм кардиомиопатий в результате мутации генов происходит нарушение синтеза и экспрессии некоторых белков, что приводит к функциональной несостоятельности органа. В настоящее время идентифицировано более 630 мутаций генов саркомера, связанных с развитием кардиомиопатии [14, 29]. Охарактеризован целый ряд белков, подверженных мутациям: тяжелые цепи β -миозина, миозин-связывающий протеин С, актин, α -тропомиозин, тропонины Т, I, С, титин, десмин, винкулин [12]. Все вышеописанные изменения макромолекулярной структуры кардиомиоцитов могут быть визуализированы с помощью метода иммуофлюоресценции с использованием меченых антител, что позволяет выявлять уменьшение или увеличение количества белков в определенной локализации и таким образом оценивать степень сохранности кардиомиоцитов.

Целью настоящей работы явилась оценка состояния основных структурных белков кардиомиоцитов на материале миокарда реципиентов в конечной стадии сердечной недостаточности с возможным выявлением нарушений, характерных для той или иной формы кардиомиопатии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы образцы миокарда левого желудочка реципиентов, подвергшихся ортотопической аллотрансплантации сердца в ФГБУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России в период с февраля 2008-го по июнь 2011 г., всего 49 удаленных сердец.

Распределение предтрансплантационного диагноза у реципиентов было следующим:

- 1) дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) – 27 человек (24 мужчины, 3 женщины); в 11 случаях имела связь заболевания с перенесенной вирусной инфекцией; в 16 случаях диагностировалась идиопатическая кардиомиопатия; возраст больных – от 18 до 59 лет;
- 2) послеродовая кардиомиопатия установлена у одной больной (27 лет);
- 3) гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – 4 человека (2 мужчин, 2 женщины), возраст 45–60 лет;
- 4) у одной реципиентки диагностировали синдром некомпактного миокарда (18 лет);

5) ишемическая кардиомиопатия (ИКМП) – 11 человек, возраст 46–68 лет;

6) 5 человек (мужчины) с диагнозом «ишемическая болезнь сердца, постинфарктный кардиосклероз», возраст 34–62 года.

Образцы миокарда замораживали в жидком азоте, затем заключали в среду OCT (Shandon Cryomatrix). Криостатные срезы исследовали с помощью непрямого метода иммуофлюоресценции. Использовали мышинные моноклональные антитела к ряду основных белков кардиомиоцитов: миозину (US Biological, USA), актину (GenWay Biotech, USA), тропонину I (US Biological, USA), десмину (US Biological, USA), винкулину (US Biological, USA), титину (US Biological, USA). В качестве вторых антител применяли антитела к иммуноглобулину мыши, меченные FITC (Dako, Denmark). Часть срезов окрашивали гематоксилином и эозином и оценивали состояние миокарда в светлом поле.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Структурные белки кардиомиоцитов в большинстве своем не обладают видовой специфичностью и могут быть изучены на материале миокарда млекопитающих [5, 9, 18]. В наших ранних работах локализация некоторых белков была продемонстрирована на миокарде быка и крысы [1, 2, 6]. Миозин на препаратах сердца быка визуализировался в области широких (анизотропных) дисков (рис. 1).

При исследовании состояния сократительных белков кардиомиоцитов пациентов (миозин, актин, тропонин I) результаты получились следующие.

Миозин в миокарде больных гипертрофической, послеродовой кардиомиопатией, у части пациентов с ишемической кардиомиопатией (6 случаев из 11), а также реципиентов с постинфарктным кардиосклерозом (исключая участки склероза) выявляли в нормальной локализации: в области широких дисков (рис. 2).

В пяти образцах миокарда больных ИКМП реакция отсутствовала в центре волокна, что, вероятно, можно объяснить результатом длительной ишемии (рис. 3).

В группе пациентов с диагнозом ДКМП локализацию миозина исследовали на материале 12 удаленных сердец. В 8 образцах выраженных изменений отмечено не было. В 4 случаях выявляли отсутствие экспрессии данного белка в миофиламентах значительного числа кардиомиоцитов, что особенно хорошо видно на поперечных срезах миокарда (рис. 4). Интересно, что в трех случаях из четырех в анамнезе больных прослеживается четкая связь манифестации заболевания с перенесенной вирусной инфекцией (у двоих пациентов в анам-

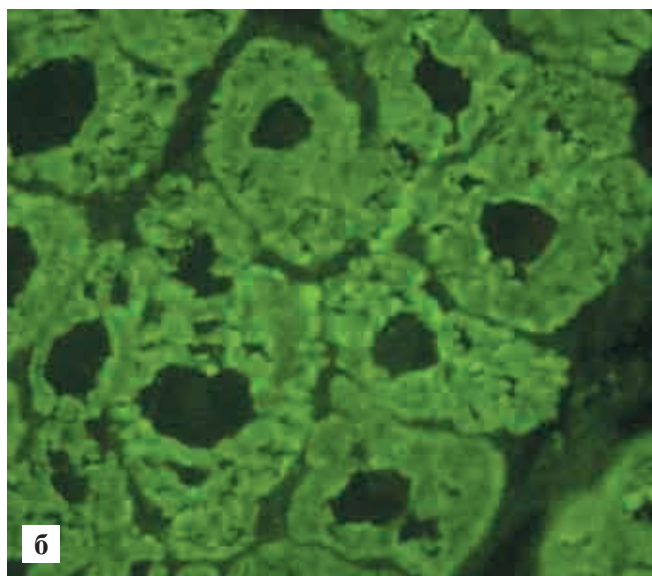
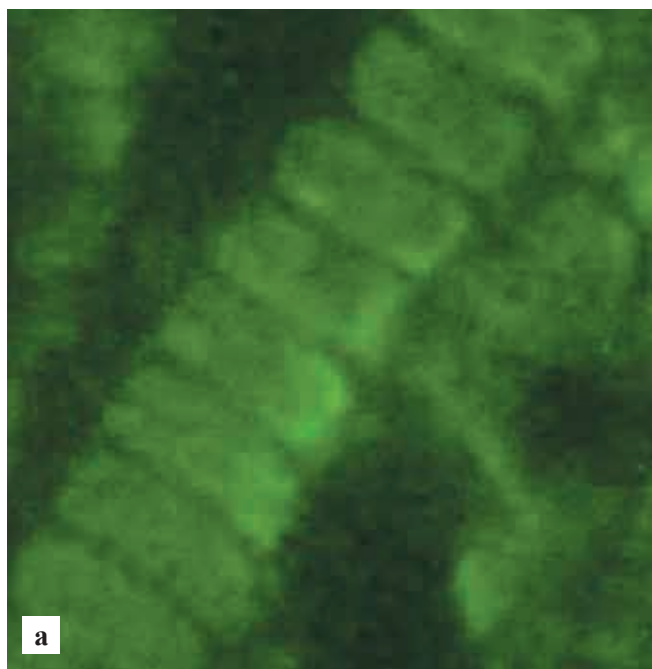


Рис. 1. Миокард сердца быка. Нормальная экспрессия миозина в зоне анизотропных дисков. Криостатные срезы, непрямой метод иммунофлюоресценции: а – продольный срез кардиомиоцитов, $\times 1000$, фотоувеличение; б – поперечный срез кардиомиоцитов, $\times 400$

незе отмечен перенесенный миокардит, у третьего дилатация сердца развилась после перенесенного гриппа).

У больных дилатационной кардиомиопатией сходную картину – отсутствие экспрессии белка в значительной части миофиламентов – мы наблюдали и при исследовании актина (исследовано 12 образцов миокарда). Такие изменения были выявлены в половине случаев (рис. 5). В одном образце реакция почти полностью отсутствовала. Следует отметить, что у данного больного дилатационная кардиомиопатия носила семейный характер.

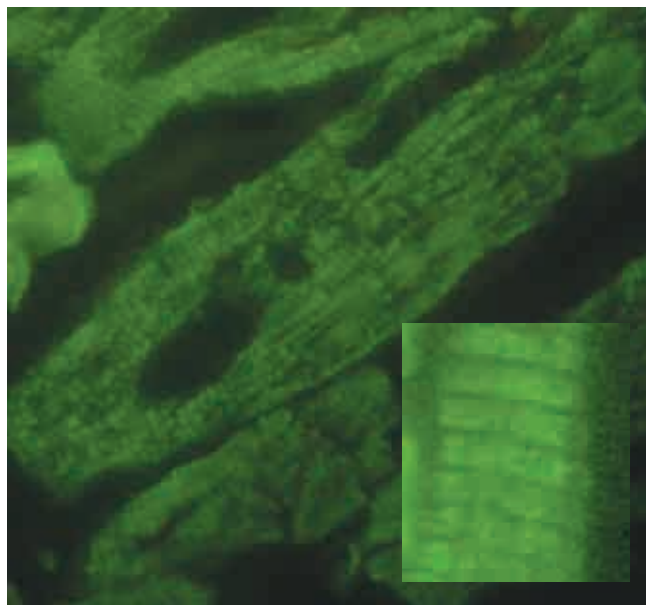


Рис. 2. Миокард реципиента с диагнозом ИКМП. Экспрессия миозина в зоне анизотропных дисков (норма). Криостатный срез, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 400$. Фрагмент микрофотографии – фотоувеличение



Рис. 3. Миокард больного ИКМП. Отсутствие экспрессии миозина в центре волокон кардиомиоцитов (стрелка). Криостатный срез, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 400$, фотоувеличение

В остальных пяти случаях экспрессия белка оставалась без изменений и визуализировалась в области узких изотропных дисков.

При исследовании миокарда больной послеродовой кардиомиопатией были выявлены обширные зоны кардиомиоцитов как с нарушенной экспрессией актина, так и сохранные участки (рис. 6)

В миокарде больных гипертрофической кардиомиопатией во всех четырех случаях актин выявляли в нормальной локализации.

В подгруппе больных ишемической кардиомиопатией в 5 образцах миокарда из 11 экспрессия ак-

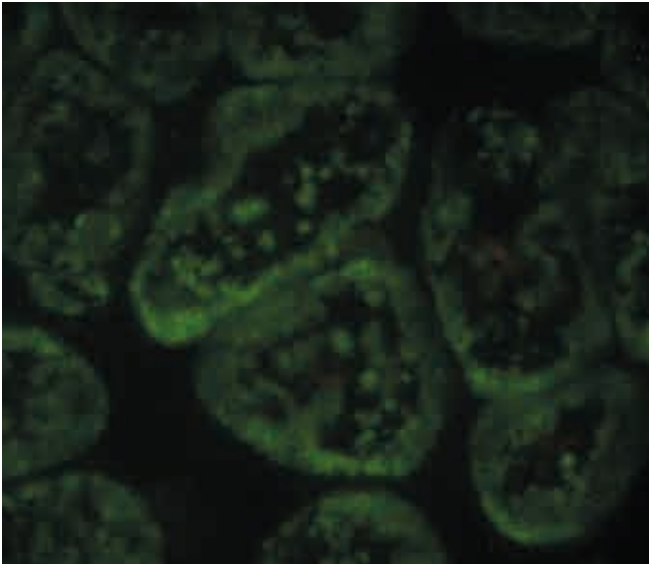


Рис. 4. Миокард больного ДКМП. Отсутствие экспрессии миозина в значительной части миофиламентов. Криостатный срез, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 1000$

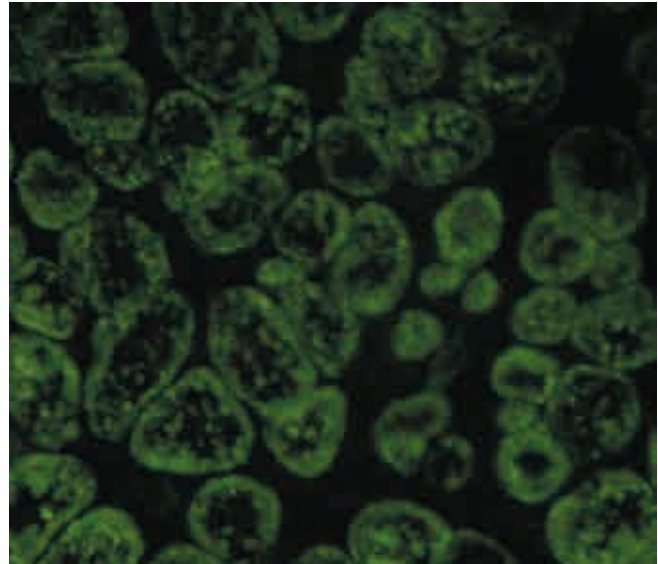


Рис. 5. Миокард больного ДКМП. Криостатный препарат, непрямой метод иммунофлюоресценции. Отсутствие экспрессии актина в значительной части миофиламентов, поперечный срез кардиомиоцитов, $\times 400$

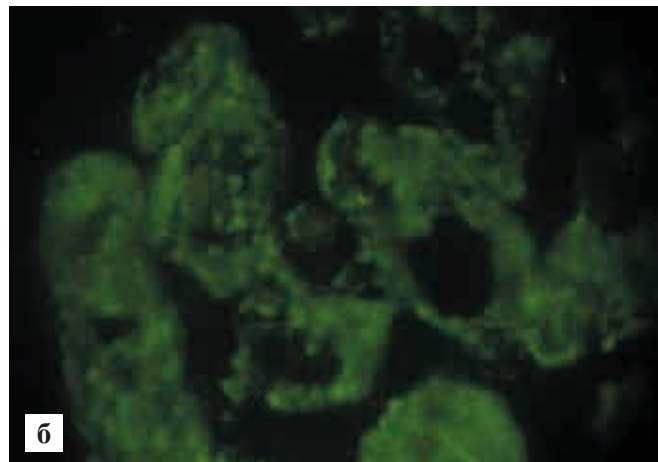
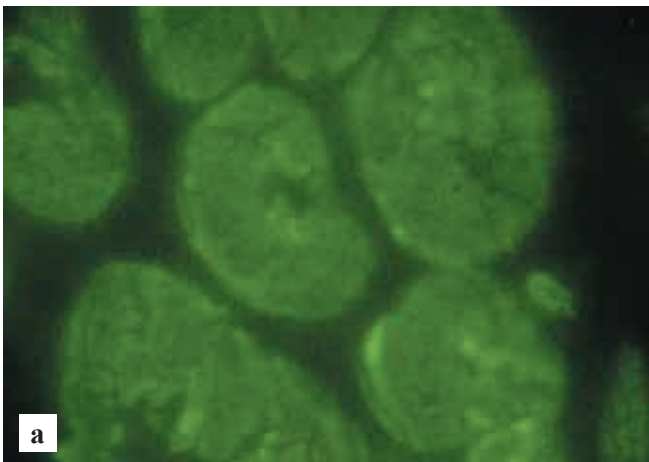


Рис. 6. Миокард больной послеродовой КМП. Криостатные препараты, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 1000$: а – нормальная экспрессия актина, поперечный срез кардиомиоцитов; б – отсутствие экспрессии актина в значительной части миофиламентов, поперечный срез кардиомиоцитов

тина была ослаблена, в остальных случаях выраженных изменений отмечено не было.

Тропонин является регуляторным глобулярным белком, состоящим из трех субъединиц, и в составе тропомиозинового комплекса участвует в процессе мышечного сокращения и расслабления. Иммунофлюоресцентным методом в норме он визуализируется в области широких сократительных дисков. При исследовании миокарда реципиентов аллотрансплантата сердца тропонин I выявляли в виде четкой реакции в области сократительных дисков в 8 из 11 случаев в подгруппе больных с диагнозом ИКМП и в 13 из 27 образцов миокарда у больных ДКМП.

Ослабление реакции в части кардиомиоцитов было отмечено в 14 случаях при исследовании

миокарда больных ДКМП и в 3 образцах миокарда больных ишемической кардиомиопатией (рис. 7). У пациентов с гипертрофической, послеродовой кардиомиопатиями, а также в сохранном миокарде больных с постинфарктным кардиосклерозом выраженных изменений экспрессии данного белка отмечено не было.

Титин – белок скелета саркомера. Благодаря эластичным свойствам данного белка после сокращения саркомер приобретает исходную конфигурацию. В норме экспрессия титина представлена в виде двойных узких дисков (рис. 8).

При изучении состояния данного белка у больных различными формами кардиомиопатии результаты нашего исследования в целом совпали с теми данными, которые были продемонстрирова-

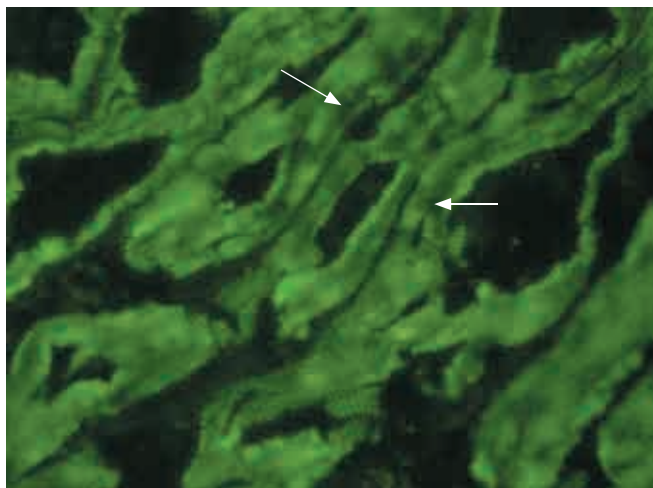


Рис. 7. Миокард больного ДКМП. Ослабление экспрессии тропонина I в участках кардиомиоцитов (стрелки). Криостатный срез, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 400$

ны в работе Костина и др. [23]. В нашем исследовании из 27 образцов миокарда больных ДКМП в 20 случаях экспрессия титина была значительно ослаблена: у двоих пациентов реакция почти полностью отсутствовала, а в 18 образцах на фоне резкого ослабления экспрессии сохранялись отдельные кардиомиоциты, в которых реакция оставалась положительной. В семи случаях в миокарде больных ДКМП содержание белка оставалось в норме.

Картину ослабления экспрессии титина мы обнаружили также в 5 образцах из 11 в подгруппе пациентов с ишемической кардиомиопатией (рис. 9). В 6 случаях выраженных изменений выявлено не было. В сохранном миокарде реципиентов с постинфарктным кардиосклерозом экспрессия белка оставалась в норме (рис. 10).

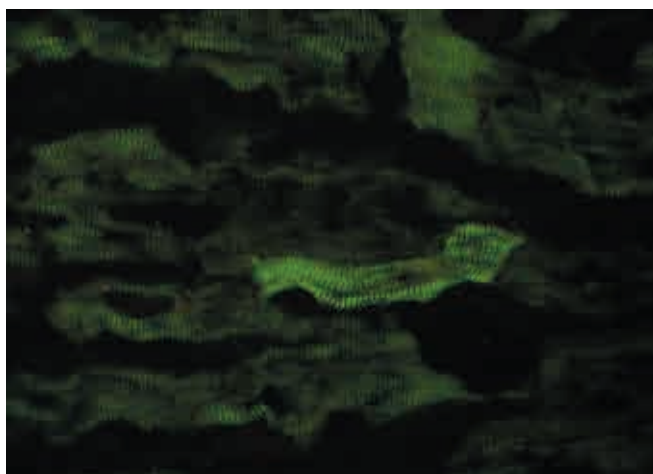


Рис. 9. Миокард больного ИКМП. Ослабление экспрессии титина в подавляющей части миокарда. Сохранение экспрессии в отдельных кардиомиоцитах. Криостатный срез, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 400$

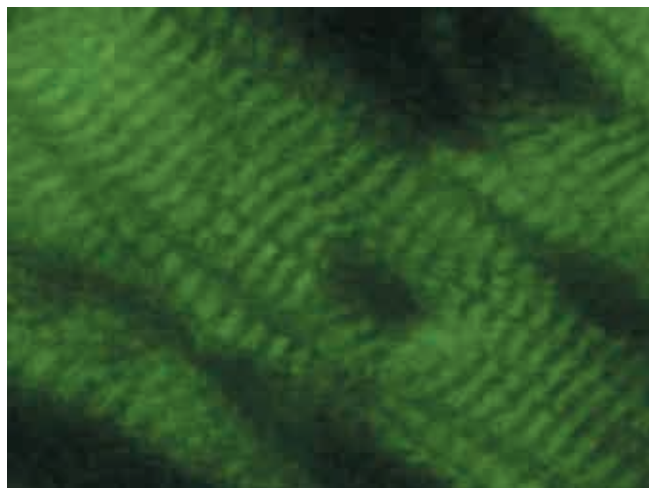


Рис. 8. Миокард сердца быка. Нормальная экспрессия титина в виде двойных дисков. Криостатный срез, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 1000$

Во всех случаях гипертрофической кардиомиопатии (4 реципиента), а также у реципиентки с постлеродовой кардиомиопатией в миокарде выявляли четкую экспрессию данного белка (рис. 10).

Наиболее интересные и четкие изменения нам удалось выявить при визуализации белков истинного и наружного цитоскелета кардиомиоцитов: десмина и винкулина. **Десмин** является белком истинного цитоскелета и входит в структуру саркомера и вставочных дисков в качестве молекулы адгезии. В норме десмин экспрессируется в области вставочных дисков и Z-линий кардиомиоцитов (рис. 11).

В отличие от работы Di Somma et al. [15] выраженного усиления экспрессии десмина в области Z-дисков у больных ДКМП нами отмечено не было. Чаще всего в данной локализации выявляли равномерное свечение либо отмечали незначительное

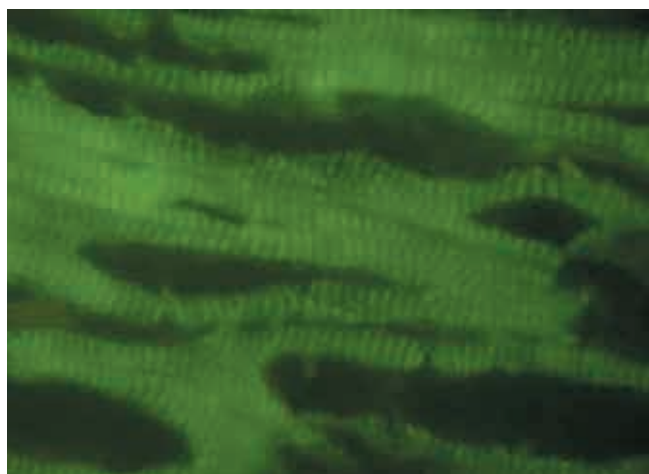


Рис. 10. Миокард больной послеродовой КМП. Нормальная экспрессия титина в кардиомиоцитах. Криостатный срез, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 400$, фотоувеличение

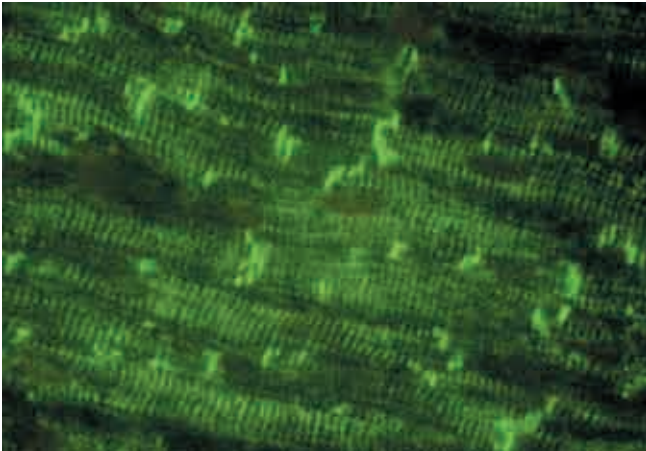


Рис. 11. Миокард сердца быка. Нормальная локализация десмина в зоне Z-линий и вставочных дисков кардиомиоцитов. Криостатный срез, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 400$

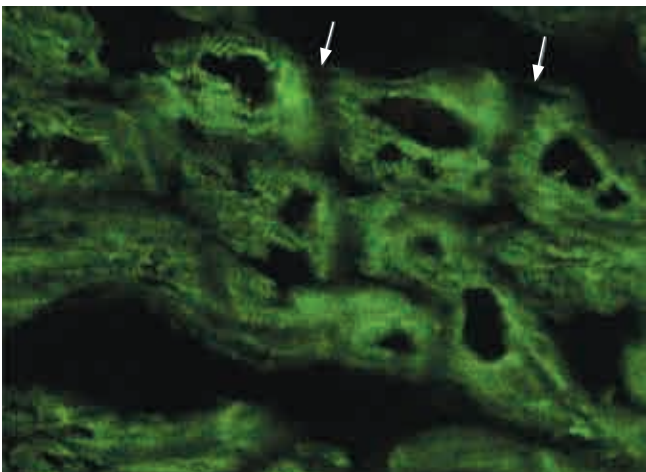


Рис. 12. Миокард больного ДКМП. Отсутствие экспрессии десмина в зоне вставочных дисков кардиомиоцитов (стрелки). В Z-дисках реакция сохранена. Криостатный срез, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 400$, фотоувеличение



Рис. 13. Миокард больного постмиокардитической ДКМП. Экспрессия десмина в зоне Z-линий и во вставочных дисках кардиомиоцитов частично сохранена. Наличие desmin-free-кардиомиоцитов (стрелка). Криостатный срез, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 400$

усиление экспрессии белка в отдельных кардиомиоцитах на фоне ослабления реакции в основной массе клеток. Мы обратили внимание, что в большинстве случаев при исследовании миокарда больных дилатационной кардиомиопатией экспрессия десмина отсутствовала во вставочных дисках кардиомиоцитов. Из 27 исследованных образцов миокарда больных данной подгруппы в 18 случаях отмечали практически полное отсутствие белка во вставочных дисках подавляющего числа кардиомиоцитов при сохранившейся экспрессии в области Z-линий (рис. 12).

В одном образце при нормальной экспрессии данного белка в области Z-линий реакция во вставочных дисках была сохранена частично и в одном случае экспрессия десмина почти полностью отсутствовала. В 7 образцах миокарда пациентов с ДКМП были выявлены обширные участки отсутствия реакции в кардиомиоцитах, так называемые desmin-free-зоны (рис. 13).

Данный феномен был отмечен S. Di Somma с соавторами при изучении миокарда больных ишемической кардиомиопатией [16]. Интересно, что в нашем исследовании во всех семи случаях имела четкая связь развития ДКМП с перенесенной вирусной инфекцией.

В подгруппе реципиентов с диагнозом ишемическая кардиомиопатия выпадение экспрессии десмина в целых группах кардиомиоцитов (desmin-free) отмечали в семи из одиннадцати случаев. В двух случаях экспрессия десмина оставалась в норме, и в двух образцах отмечали значительное ослабление реакции в области вставочных дисков. У пациентов с постинфарктным кардиосклерозом desmin-free-картину выявляли в трех случаях из пяти, в двух образцах локализация белка оставалась нормальной.

Винкулин – мембраноассоциированный белок, который связывает актин цитоскелета с сарколеммой и локализован в области сарколеммы, в так называемых костамерах, в зоне Z-линий, а также входит в состав вставочных дисков [31]. В здоровом миокарде при иммунофлюоресцентном окрашивании костамеры практически незаметны и представлены в виде линейной реакции по окружности кардиомиоцита на поперечном срезе либо в латеральной части кардиомиоцита на продольном срезе. Экспрессия винкулина в норме области Z-линий выражена слабее, чем экспрессия десмина (рис. 14).

При исследовании экспрессии винкулина в подгруппе реципиентов с дилатационной кардиомиопатией были отмечены следующие изменения: из двадцати семи случаев в одиннадцати образцах локализация белка в области сарколеммы оставалась в норме, в 11 случаях была выявлена гипертрофия костамеров (рис. 15).

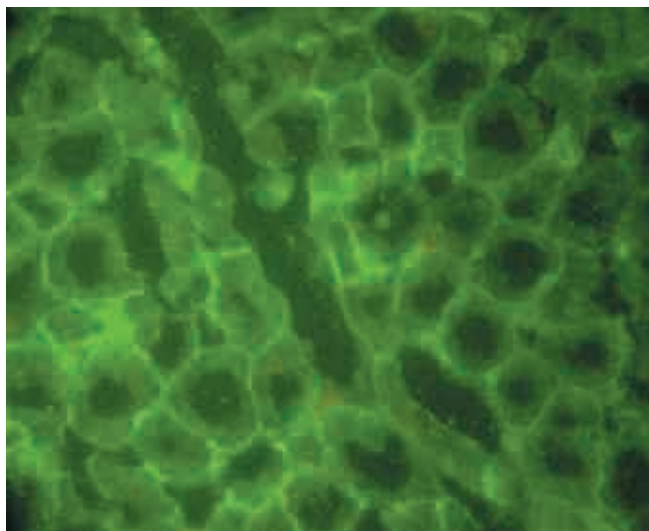


Рис. 14. Миокард сердца быка, поперечный срез. Нормальная локализация винкулина в зоне сарколеммы кардиомиоцитов. Криостатный срез, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 400$

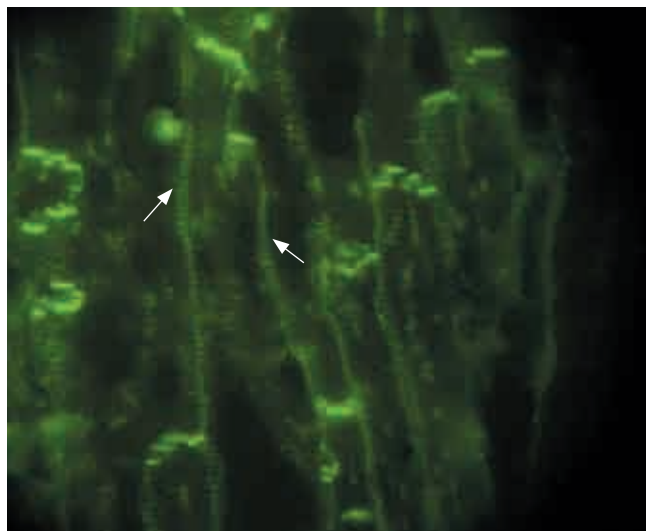


Рис. 15. Миокард больного дилатационной кардиомиопатией, продольный срез кардиомиоцитов. Гипертрофия костамеров (стрелки). Криостатный препарат, реакция с антителами к винкулину, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 400$, фотоувеличение

Интересно, что в 22 образцах из 27 отмечали усиление реакции в зоне Z-линий, что выглядело как выраженная, часто нерегулярная поперечная исчерченность саркоплазмы кардиомиоцитов. При этом в двух случаях (миокард больного с ДКМП и пациентки с синдромом некомпактного миокарда) на фоне такого усиления отмечали ослабление экспрессии белка в области костамеров (рис. 16). Необходимо отметить, что возраст реципиентов, в удаленных сердцах которых отмечали ослабление реакции в зоне костамеров, не превышал 23 лет (18 и 23 года).

Следует подчеркнуть, что в образцах миокарда четырех реципиентов данной подгруппы было обнаружено формирование тяжелой винкулина, пронизывавших саркоплазму кардиомиоцита от цитоплазматической мембраны клетки вплоть до перинуклеарной области кардиомиоцитов (рис. 17):

При исследовании миокарда пациентки с послеродовой кардиомиопатией наряду с резкой гипертрофией костамеров выявили усиление экспрессии белка в области Z-линий, которое визуализировалось как диффузная, равномерная, тонкая исчерченность цитоплазмы. В миокарде реципиентов с гипертрофической кардиомиопатией в двух случаях локализация винкулина оставалась в норме, в одном образце отмечали гипертрофию костамеров и в одном случае одновременно с увеличением костамеров отмечали дискретное усиление реакции в цитоплазме (рис. 18). Данный тип распределения винкулина был отмечен группой J. Schaper [27]. Исследователи объяснили это инвагинацией Т-трубочек в сарколемму кардиомиоцита и усилением экспрессии винкулина в данной локализации,

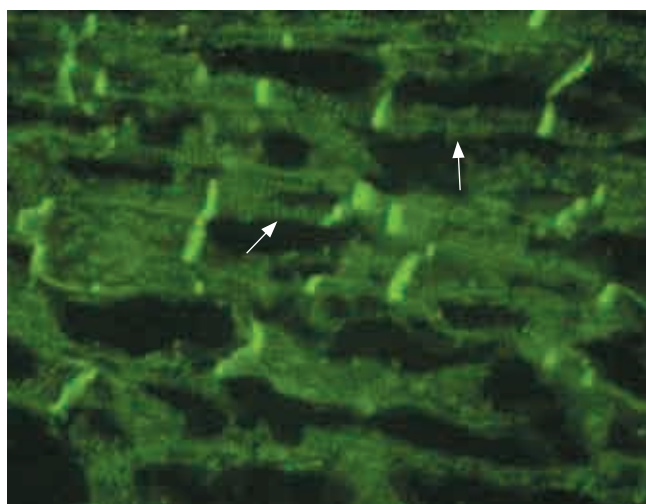


Рис. 16. Миокард больного дилатационной кардиомиопатией, продольный срез кардиомиоцитов. Усиление экспрессии винкулина в цитоплазме кардиомиоцитов. Ослабление реакции в области костамеров (стрелки). Криостатный препарат, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 400$

что в дальнейшем было подтверждено в работе Костина с соавторами [22].

В подгруппе реципиентов с ишемической кардиомиопатией в 6 из 11 образцов миокарда локализация винкулина оставалась в норме, в четырех образцах отмечали усиление реакции в области Z-линий и в одном случае выявили гипертрофию костамеров. Усиление экспрессии данного белка в зоне Z-линий было обнаружено в миокарде двоих реципиентов с постинфарктным кардиосклерозом, у остальных пациентов этой подгруппы винкулин визуализировался в нормальной локализации.

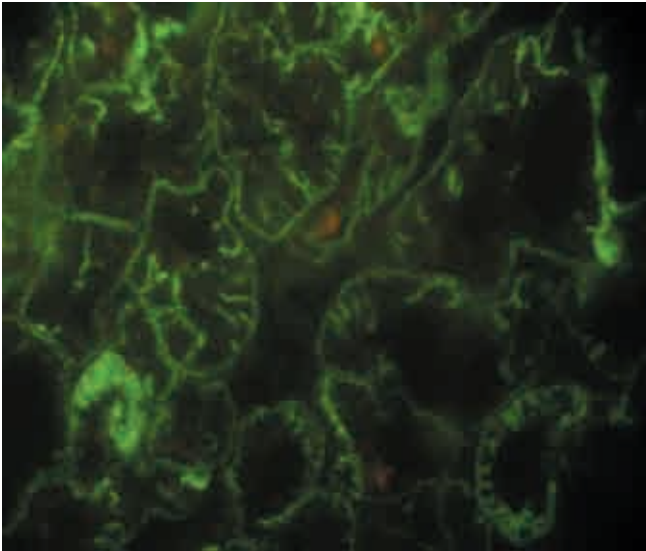


Рис. 17. Миокард больного дилатационной кардиомиопатией, поперечный срез кардиомиоцитов. Проникновение винкулина глубоко в цитоплазму клетки. Криостатный препарат, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 1000$

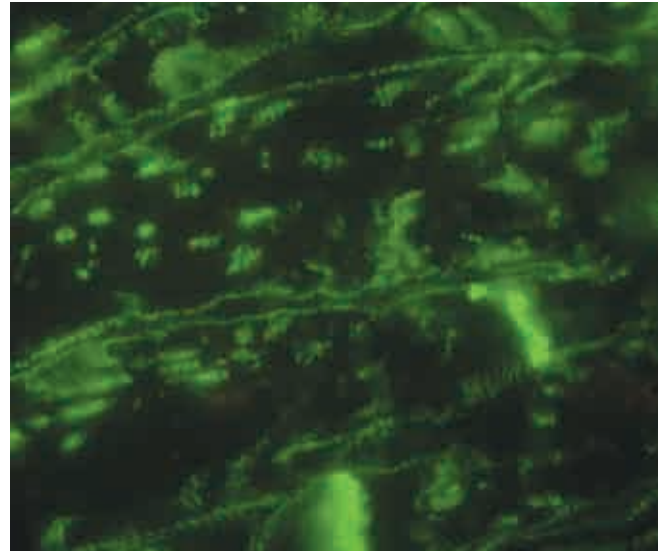


Рис. 18. Миокард больной гипертрофической кардиомиопатией, поперечный срез кардиомиоцитов. Усиление экспрессии винкулина в зоне Т-трубочек, проникающих в цитоплазму кардиомиоцита. Криостатный препарат, непрямой метод иммунофлюоресценции, $\times 1000$

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования нам удалось продемонстрировать, что в конечной стадии сердечной недостаточности молекулярная структура кардиомиоцитов претерпевает серьезные изменения. При этом нарушения в белках сократительного аппарата (миозин и актин) были обнаружены в относительно небольшом числе случаев. Это можно объяснить, с одной стороны, тем, что исследования данных белков проводили лишь на части удаленных сердец. С другой стороны, наличие мутаций, приводящих к выраженному нарушению синтеза сократительных белков, вероятнее всего, влечет за собой резкое, практически не компенсируемое ухудшение функции сердца, в результате чего больные погибают еще в детском возрасте. Однако мутации генов, отвечающих за синтез сократительных белков миокарда, скорее всего, не являются единственной причиной повреждения сократительного аппарата кардиомиоцитов. Так, в экспериментальной работе, выполненной группой Saforio et al. [10], показано, что тяжелые цепи α - и β -сердечного миозина являются мишенью для аутоантител при дилатационной кардиомиопатии. Пусковым механизмом развития данного процесса может послужить вирусная инфекция, что было продемонстрировано Saforio et al. в более поздней работе [11]. Интересно, что в нашем исследовании в подгруппе пациентов с ДКМП из четырех случаев отсутствия экспрессии миозина в зоне анизотропных дисков в трех прослеживалась четкая анамнестическая связь манифестации заболевания с вирусной инфекцией. У четвертого пациента со сходной иммуногистохимической кар-

тиной такой связи не выявлено, однако его возраст на момент выполнения аллотрансплантации сердца (54 года) позволяет предположить вторичное развитие дилатационной кардиомиопатии. Отсутствие экспрессии миозина в центре волокна в образцах миокарда больных с диагнозом ишемическая кардиомиопатия позволяет сделать предположение о влиянии ишемии на состояние макромолекулярной структуры кардиомиоцитов и допустить возможность существования соматической мутации белков. Такая возможность на протяжении многих лет отрицалась, так как считалось, что у взрослого человека кардиомиоциты практически не пролиферируют [5]. Однако в последние годы появился ряд статей, в которых данное утверждение опровергается [8, 28].

При оценке содержания тропонина I в миокарде пациентов с различными формами кардиомиопатии и аллотрансплантатом сердца мы получили ожидаемые результаты: резких изменений в содержании данного белка отмечено не было. Уменьшение экспрессии и перераспределение содержания тропонина I было отмечено у половины пациентов с диагнозом дилатационная кардиомиопатия и менее чем у трети (в трех образцах из одиннадцати) пациентов с диагнозом ишемическая кардиомиопатия. Данные результаты нашли подтверждение в обзорной статье Chang, где показано, что мутации генов, ответственных за синтез тропонинов, в том числе и тропонина I, могут приводить к развитию различных форм кардиомиопатии [13].

Титин, как было сказано выше, отвечает за эластичную прочность саркомера и играет важную

роль в процессе растяжения и сокращения мышечного волокна. Возможное участие нарушения экспрессии данного белка в развитии тяжелой патологии миокарда было показано в работе Костина с соавторами (2000), что совпадает с результатами нашего исследования: в 20 из 27 образцов миокарда больных ДКМП, а также в 5 из 11 образцов миокарда больных ИКМП выявлено резкое ослабление экспрессии. Участие мутаций генов, ответственных за синтез титина, в развитии дилатационной кардиомиопатии было подтверждено также группой исследователей под руководством Herman [21]. Мутации выявляли в 25% случаев у больных семейной формой кардиомиопатии и в 18% в случае спорадического возникновения заболевания.

Как было отмечено выше, наиболее яркие изменения мы обнаружили при оценке состояния десмина и винкулина в исследуемых образцах миокарда. Перераспределение десмина в миокарде больных дилатационной кардиомиопатией было отмечено еще в 1991 году группой исследователей под руководством J. Schaperg на небольшом количестве материала (8 эксплантационных сердец). Авторы подчеркивали нерегулярность расположения Z-линий, а также усиление реакции в цитоплазме кардиомиоцитов в исследуемом миокарде по сравнению с контрольной группой. В более поздней работе Di Somma et al. [15] также отмечали нерегулярное расположение десмина и усиление реакции в зоне Z-линий. В нашем исследовании выраженного усиления реакции в области Z-дисков мы не отмечали, скорее наоборот, на фоне ослабленной экспрессии белка в части клеток экспрессия оставалась нормальной. Данный факт можно объяснить рядом причин: субъективностью оценки препаратов, различием методик (группа Di Somma окрашивали препараты иммунопероксидазным методом), а также особенностями популяции больных.

В наших ранних работах [2, 6], проведенных на незначительном количестве материала, мы обратили внимание на интересную особенность распределения десмина в миокарде больных дилатационной кардиомиопатией: экспрессия белка отсутствовала в области вставочных дисков кардиомиоцитов. В настоящем исследовании такая картина наблюдалась в 18 из 27 образцов миокарда больных дилатационной кардиомиопатией. Вставочные диски являются сложным образованием, состоящим из значительного числа белковых соединений, в том числе и десмина [1, 18, 26]. Помимо механического соединения отдельных клеток мышечного волокна вставочные диски обеспечивают передачу сигнала сокращения и расслабления от одного кардиомиоцита другому. Для обеспечения оптимальных условий функционирования сердца обязательным

является нормальное соотношение белков [17, 18]. Очевидно, что выпадение даже одного компонента из такой структуры может приводить к неуклонному ухудшению функции органа, хотя последствия такого нарушения не настолько критичны, как при повреждениях сократительного аппарата кардиомиоцита. Вероятно, это происходит за счет частичной компенсации функции десмина другими белками, входящими в состав вставочного диска. Интересным является наблюдение почти полного отсутствия десмина в кардиомиоцитах миокарда больного этой подгруппы. Аллотрансплантация сердца данному пациенту была выполнена в возрасте 23 лет. Еще один случай практически полного отсутствия экспрессии десмина был выявлен нами при исследовании аутопсийного материала 19-летнего больного дилатационной кардиомиопатией, в дальнейшем у этого пациента при генетическом исследовании материала были обнаружены нарушения в гене, отвечающем за синтез десмина (результаты исследования не вошли в данную работу). Вероятно, при угнетении синтеза десмина и полном исчезновении его из структур кардиомиоцита происходит резкое нарушение функции миокарда, требующее трансплантации органа либо приводящее к гибели пациента [1].

Резкое ослабление экспрессии десмина во вставочных дисках кардиомиоцитов больных ИКМП (2 случая из 11) можно объяснить развитием сочетанной патологии миокарда. Так, в обзорной статье Luk et al. [24] показана возможность вторичного развития ДКМП на фоне атеросклеротического поражения сосудов.

В большинстве образцов миокарда больных ИКМП (7 из 11), а также у части больных ДКМП (7 из 27) мы наблюдали картину так называемых desmin-free-кардиомиоцитов. Интересно, что во всех семи случаях развития ДКМП у больных имелась четкая анамнестическая связь с перенесенной вирусной инфекцией. Такие сходные изменения кардиомиоцитов в миокарде больных с различной патологией позволяют предположить наличие общих механизмов, приводящих к нарушению структурных белков, вне зависимости от основной причины заболевания. Подобное предположение было высказано в работе Hein et al. [20].

Общие для разных патологий изменения были отмечены также при оценке состояния винкулина и заключались в гипертрофии костамеров и накоплении белка в области Т-трубочек, что визуализировалось при иммунофлюоресцентном окрашивании как усиление реакции в зоне Z-линий. Скорее всего, на определенном этапе усиление экспрессии винкулина в данных областях является компенсаторным механизмом. Однако чрезмерное его накопление может затруднять передачу сигнала

сокращения и расслабления из клетки экстрацеллюлярному матриксу и обратно в области костамеров, а также препятствовать выходу ионов кальция из Т-трубочек в саркоплазму клетки, что резко снижает способность сердечной мышцы к сокращению и ведет к усилению так называемой жесткости миокарда. Наибольшая степень накопления винкулина в области Т-трубочек была отмечена при дилатационной кардиомиопатии. Подобное явление, вероятно, обусловлено мутацией генов, ответственных за синтез винкулина и связывание белка в характерной для него локализации [2]. Интересны также два случая практически полного отсутствия экспрессии винкулина в зоне костамеров и сарколеммы кардиомиоцитов, выявленные в нашем исследовании. В экспериментальной работе группой Zemljic-Harpf et al. [30] было продемонстрировано, что в группе линейных мышей с нокаутом по гену винкулина особи начали погибать с 6-недельного возраста, ни один грызун не дожил до 6 месяцев. Экстраполируя возраст животных на человека, авторы пришли к выводу, что при повреждении гена, ответственного за синтез винкулина, патологические события (внезапная смерть, развитие кардиомиопатии) у людей могут происходить в подростковом или молодом взрослом возрасте. Нашим пациентам, в кардиомиоцитах которых выявили отсутствие экспрессии винкулина в зоне сарколеммы и костамеров, аллотрансплантация сердца была выполнена в возрасте 18 и 23 лет.

Характеристика нарушений структуры кардиомиоцитов, продемонстрированная нами на образцах миокарда больных различными формами кардиомиопатии, могла бы быть полезна клиницистам не только с точки зрения уточнения диагноза. Визуализация состояния структуры миокарда может использоваться также в качестве оценки эффективности левожелудочного обхода, который в последние годы рассматривается некоторыми авторами как альтернатива трансплантации сердца [4, 7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования были выявлены изменения структурных белков кардиомиоцитов, характерные для дилатационной кардиомиопатии, а также нарушения, сходные у больных с различной патологией, что, вероятно, обусловлено наличием общих механизмов повреждения вне зависимости от основной причины заболевания.

Возможность визуализации и оценки состояния макромолекулярной структуры миокарда может быть использована с целью уточнения этиологии заболевания, а также применяться в качестве контроля лечения при альтернативных способах терапии конечной стадии сердечной недостаточности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белецкая Л.В., Куприянова А.Г., Ильинский И.М., Северин В.В. Молекулярно-биологическая структура кардиомиоцита // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2006. № 4. С. 89–94.
2. Белецкая Л.В., Куприянова А.Г., Куренкова Л.Г., Гольц А.М., Кормер А.А. Изменения макромолекулярной структуры кардиомиоцитов при идиопатической кардиомиопатии // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2007. Т. 34. № 2. С. 33–35.
3. Благова О.В., Недоступ А.В., Коган Е.А. и др. Дилатационная кардиомиопатия как клинический синдром: опыт нозологической диагностики с использованием биопсии и подходы к лечению // Терапевтический архив. 2011. Т. 83. № 9. С. 41–48.
4. Иткин Г.П., Трухманов С.Б., Шемакин С.Ю. и др. Применение вспомогательных насосов для восстановления функции миокарда у пациентов с хронической сердечной недостаточностью // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2011. № 3. С. 82–85.
5. Румянцев П.П. Кардиомиоциты в процессах дифференцировки и регенерации. Ленинград: Наука. 1982. 315 с.
6. Beletskaya L.V., Kupriyanova A.G., Zaidenov V.A. et al. Altered cytoskeletal protein localization in cardiomyocytes of idiopathic cardiomyopathy patients // J. Heart Lung Transplant. Aug. 2007. Vol. 26. № 8. P. 868–870.
7. Aquila L.A., McCarthy P.M., Smedira N.G. et al. Cytoskeletal structure and recovery in single human cardiac myocytes // J Heart Lung Transplant. 2004. Vol. 8. P. 954–963.
8. Bergmann O., Bhardwaj R.D., Bernard S. et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans // Science. 2009. Vol. 324. P. 98–102.
9. Borrmann C.M., Grund C., Kuhn C. et al. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adhaerens molecules in the intercalated disk // Eur. J. Cell. Biol. 2006.
10. Caforio A.L., Grazzini M., Mann J.M. et al. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy // Circulation. 1992. Vol. 85. P. 1734–1742.
11. Caforio A.L., Calabrese F., Angelini A. et al. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis // European Heart Journal. 2007. Vol. 28. P. 1326–1333.
12. Chang A.N. and Potter J.D. Sarcomeric Protein Mutations in Dilated Cardiomyopathy // Heart Failure Reviews. 2005. Vol. 10. P. 225–235.
13. Chang A.N., Parvatiyar M.S., Potter J.D. Troponin and cardiomyopathy // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2008. Vol. 369. P. 74–81.
14. Charron P. Clinical genetics in cardiology // Heart. 2006. Vol. 92. P. 1172–1176.
15. Di Somma S., Marotta M., Salvatore G. et al. Changes in myocardial cytoskeletal intermediate filaments and myocyte contractile dysfunction in dilated cardiomyopathy: an in vivo study in humans // Heart. 2000. Vol. 84. P. 659–667.

16. Di Somma S., Di Benedetto M.P., Slavatore G., et al. Desmin-free cardiomyocytes and myocardial dysfunction in end stage heart failure // *Eur. J. Heart. Fail.* 2004. Vol. 6. P. 389–398.
17. Ehler E., Perriard J.K. Cardiomyocyte cytoskeleton and myofibrillogenesis in healthy and diseased heart // *Heart Fail Rev.* 2000. Vol. 3. P. 259–269.
18. Franke W.W., Borrmann C.M., Grund C., Pieperhoff S. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardio-myocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins // *Eur. J. Cell. Biol.* 2006. Vol. 85. № 2. P. 69–82.
19. Grogan M., Redfield M.M., Bailey K.R. et al. Long-term outcome of patients with biopsy-proven myocarditis: comparison with idiopathic dilated cardiomyopathy // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1995. Vol. 26. P. 80–84.
20. Hein S., Kostin S., Heling A. et al. The role of cytoskeleton in heart failure // *Cardiovascular Research.* 2000. Vol. 45. P. 273–278.
21. Herman D.S., Lam L., Taylor M.R. et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy // *N. Engl. J. Med.* 2012. Feb 16. Vol. 336 (7). P. 619–628.
22. Kostin S., Scholz D., Shimada T. et al. The internal and external protein scaffold of the T-tubular system in cardiomyocytes // *Cell Tissue Res.* 1998. Vol. 294. P. 449–460.
23. Kostin S., Hein S., Arnon E., Scholz D., Schaper J. The cytoskeleton and related proteins in human failing heart // *Heart Fail. Rev.* 2000. Vol. 3. P. 271–280.
24. Luk A., Ahn E., Soor GS et al. Dilated cardiomyopathy: a review // *J. Clin. Pathol.* 2009. Vol. 62. P. 219–225.
25. Maron B.J., Towbin J.A., Thiene G. et al. Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies // *Circulation.* 2006. Vol. 113. P. 1807–1816.
26. Pieperhoff S., Barth M., Rickelt S., Franke W.W. Desmosomal Molecules In and Out of Adhering Junctions: Normal and Diseased States of Epidermal, Cardiac and Mesenchymally Derived Cells // *Dermatol. Res Pract.* Volume 2010, Article ID 139167, 12 pages, doi:10.1155/2010/139167
27. Shaper J., Froede R., Hein St. et al. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy // *Circulation.* 1991. Vol. 83. № 2. P. 504–505.
28. Urbanek K., Torella D., Sheikh F. et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure // *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005. 102: 8692–8697.
29. Xu Q., Dewey S., Nguyen S., Gomes A.V. Malignant and benign mutations in familial cardiomyopathies: insights into mutations linked to complex cardiovascular phenotypes // *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2010 May. Vol. 48 (5). P. 899–909.
30. Zemljic-Harpf A., Miller J.C., Henderson S.A. et al. Cardiac – myocyte-specific excision of the vinculin gene disrupts cellular junctions, causing sudden death or dilated cardiomyopathy // *Mol. Cell. Biol.* 2007. Vol. 27. P. 7522–7537.
31. Zemljic-Harpf A., Manso A.M., Ross S.R. Vinculin and Talin: Focus on the Myocardium // *J. Investig. Med.* 2009. Vol. 57 (8). P. 849–855.
32. Zhao P., Sharma A.C., Ren J. Pathogenesis and therapy of autoimmunity-induced dilated cardiomyopathy // *Front Biosci.* 2009 Jan 1. Vol. 14. P. 1708–1715.